

EDNRA 基因 rs5335 多态性与 aSAH 后迟发性脑血管痉挛的关联性研究*

朱 峰, 张 鹏, 宋建荣, 何 蓓, 梁 媛 (宝鸡市中心医院神经外科, 陕西宝鸡 721008)

摘要:目的 探讨动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)后迟发性脑血管痉挛(DCVS)与内皮素受体 A(EDNRA)基因 rs5335 多态性的关系。方法 选择 2015 年 1 月~2017 年 1 月在宝鸡市中心医院神经外科治疗的 133 例 aSAH 患者纳入研究,按照是否并发 DCVS 分为 DCVS 组 78 例和对照组 55 例,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测 EDNRA 基因 rs5335 位点多态性。结果 DCVS 组和对照组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($\chi^2=0.295, P=0.863$; $\chi^2=0.652, P=0.722$)。在等位基因模型和显性基因模型下,DCVS 组和对照组比较,rs5335 位点等位基因、基因型分布频率差异均具有统计学意义($\chi^2=4.213, P=0.040$; $\chi^2=4.790, P=0.029$),隐性基因模型下两组基因型差异无统计学意义($\chi^2=1.299, P=0.254$)。多因素 Logistic 回归法分析结果显示对于 aSAH 患者,携带等位基因 C 可降低 DCVS 发生风险($OR=0.572, 95\% CI 0.401\sim 0.872, P=0.021$)。结论 EDNRA 基因 rs5335 位点多态性与 aSAH 患者发生 DCVS 相关。

关键词:内皮素受体 A;动脉瘤性蛛网膜下腔出血;迟发性脑血管痉挛;基因多态性

中图分类号:R743.9;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)06-056-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.016

Association between Polymorphism of Endothelin Receptor Type A and Delayed Cerebral Vasospasm in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage

ZHU Feng, ZHANG Peng, SONG Jian-rong, HE Bei, LIANG Yuan

(Department of Neurosurgery, Baoji Central Hospital, Shaanxi Baoji 721008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genetic association between endothelin receptor type A (EDNRA) gene polymorphism and delayed cerebral vasospasm (DCVS) in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH). **Methods** 133 aSAH patients from January 2015 to January 2017 were recruited to participate in the study. According to whether combined with DCVS, they were divided into the DCVS group (78 cases) and the control group (55 cases). Genotype was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism combined with DNA direct sequencing technique for the polymorphism of the EDNRA gene. **Results** Samples of DCVS group and control group both were consistent with Hardy-Weinberg's law of inheritance ($\chi^2=0.295, P=0.863$; $\chi^2=0.652, P=0.722$). There were significant differences of EDNRA gene rs5335 polymorphism between DCVS group and control group, under allele model ($\chi^2=4.213, P=0.040$) and the dominant model ($\chi^2=4.790, P=0.029$). However, there was no difference of EDNRA gene polymorphism between DCVS group and control group under recessive model ($\chi^2=1.299, P=0.254$). Multivariate Logistic regression analysis showed that allele C was protective factor of DCVS for aSAH patients ($OR=0.572, 95\% CI 0.401\sim 0.872, P=0.021$). **Conclusion** For aSAH patients, EDNRA gene rs5335 polymorphism may closely related to DCVS.

Keywords: endothelin receptor type A; aneurysmal subarachnoid hemorrhage; delayed cerebral vasospasm; gene polymorphism

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH)患者常见的继发性改变之一,往往会导致患者神经功能缺损加重,病残率和死亡率增高^[1]。迟发性脑血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS),又称持续性 CVS,一般在 SAH 发病 48 h 以后出现,其发生的具体机制复杂,目前尚不明确,可能涉及炎症反应,血管舒张/收缩因子失衡,血管壁结构变化及基因易感性等多方面因素^[2,3]。内皮素是迄今为止发现作用最强的

缩血管因子,可通过与内皮素受体 A(endothelin receptor type A, EDNRA)结合发挥缩血管作用,不少研究发现 DCVS 患者并发内皮素水平异常^[4,5],但目前尚缺少 EDNRA 与 DCVS 的相关性研究。本研究以中国北方汉族 aSAH 患者作为研究对象,观察 EDNRA 基因 rs5335 多态性与 DCVS 的相关性,为临床工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 1 月~2017 年 1 月于我院神经外科治疗的 aSAH 患者纳入研究,纳

* 作者简介:朱 峰(1981—),男,大学本科学历,主治医师,研究方向:神经疾病临床研究治疗,E-mail:zhufeng198102@163.com。

入标准:①年龄 >18 岁, ≤ 80 岁;②出生并长期生活于中国北方地区的汉族人;③aSAH 诊断符合2012年美国动脉瘤性蛛网膜下腔出血诊治指南^[6],并经脑血管造影和(或)脑血管CTA检查确认。排除标准:①并发可疑颅脑外伤;②发病3天内出现脑疝,死亡;③既往并发卒中、颅内肿瘤等严重神经疾病;④肝肾等重要脏器严重器质性病变或功能障碍。本研究共纳入133例患者,其中男性82例,女性51例,平均年龄 50.7 ± 9.2 岁。参照文献^[7]制定DCVS诊断标准,按照是否并发DCVS进一步将aSAH患者分为DCVS组和对照组,其中DCVS组78例,包括男性52例,女性26例,平均年龄 50.2 ± 9.2 岁;对照组55例,包括男性30例,女性25例,平均年龄 51.3 ± 10.4 岁,两组患者性别、年龄差异均无统计学意义($\chi^2 = 2.005, P = 0.157; t = 0.643, P = 0.521$)。本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有入组患者充分知情同意。

1.2 试剂与仪器 DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,引物为上海化工生物技术有限公司提供,PCR仪及高速低温离心机均购自德国Eppendorf公司,垂直电泳槽购自北京六一仪器厂,DNA测序仪为美国ABI 3730XL型。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法:参考2012年美国动脉瘤性蛛网膜下腔出血诊治指南^[6];根据患者病情选择合适手术方式及手术时机,完善CTA和(或)DSA检查以明确动脉瘤部位及瘤颈大小,本研究71例患者行介入栓塞治疗,62例行开颅动脉瘤夹闭术治疗。

此外基础治疗包括:①尼莫地平预防CVS,疗程大于21天;②短疗程(通常 <72 h)抗纤溶治疗;③预防性抗癫痫治疗;④维持电解质及酸碱平衡,及合理降糖降压等对症处理。

1.3.2 基因多态性检测:采集清晨空腹时外周静脉血以提取全血基因组DNA,严格按照DNA提取试剂盒使用说明操作。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测EDNRA基因rs5335多态性。本研究引物(上游:5'-AACACAGACCG-GAGCAGCCATA-3',下游:5'-GGGTGTGG-GAGTGAATTAAGGAAGAA-3')由上海生物技术有限公司提供。PCR反应条件:95℃预变性4 min;95℃20 s,55℃30 s,72℃30 s顺序循环30周期;72℃延长3 min。扩增产物使用限制性内切酶TSP45 I进行酶切,取酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄片。

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0统计软件分析处理,计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用 t 检验;计数资料结果以构成百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用Hardy-Weinberg平衡定律检验评价各组基因分布情况。采用二分类多因素Logistic后退逐步回归法评价EDNRA基因多态性与aSAH患者发生DCVS的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg遗传平衡检验结果 见表1。两组基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡,具有群体代表性。

表1 EDNRA基因rs5335位点基因型 Hardy-Weinberg遗传平衡检验

组 别	实际例数				H-W 理论例数				χ^2	P
	基因型			总计	基因型			总计		
	GG	GC	CC		GG	GC	CC			
DCVS 组	26	36	16	78	24.8	38.4	14.8	78	0.295	0.863
对照组	9	30	16	55	10.5	27.1	17.5	55	0.652	0.722

2.2 EDNRA基因rs5335位点多态性与DCVS的关系 见表2。在等位基因模型和显性基因模型下,DCVS组和对照组比较,rs5335位点等位基因、基因型分布频率差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 多因素Logistic回归分析 见表3。多因素Logistic回归分析结果显示对于aSAH患者,EDNRA基因rs5335位点等位基因C可降低DCVS发生风险。

表2 不同基因模型下两组患者rs5335位点基因型/等位基因分布频率比较[n(%)]

基因模型	DCVS组	对照组	χ^2	P
等位基因模型	G	88(56.4)	4.213	0.040
	C	68(43.6)		
显性基因模型	GG	26(33.3)	4.790	0.029
	GC+CC	52(66.7)		
隐性基因模型	CC	16(20.5)	1.299	0.254
	GG+GC	62(79.5)		

表 3

多因素 Logistic 回归分析结果

变量	B	S.E	Wals	OR	95%CI	P值
等位基因 C	-0.559	0.336	2.764	0.572	(0.401~0.872)	0.021
高 Fisher 分级	0.318	0.208	2.338	1.374	(1.068~3.310)	0.031
发 热	0.205	0.312	0.431	1.225	(1.034~3.665)	0.043

3 讨论 DCVS 是 SAH 患者最常见的并发症之一,有研究称其发生率可能超过 70%,一旦发生往往会加重患者神经功能缺损,甚至直接威胁患者生命。积极有效地防治 DCVS 对降低 aSAH 患者死亡率、残疾率具有重要意义^[2,3]。有研究发现即使积极正规予以尼莫地平治疗,仍然有不少患者并发 DCVS。因此有理由认为基因遗传因素可能在 DCVS 发作中具有重要作用。近年来,多种基因多态性被发现与 DCVS 发作相关,其中包括儿茶酚胺氧位甲基转移酶基因、内皮型一氧化氮合成酶基因、触珠结合蛋白基因、载脂蛋白 E 基因等^[8,9]。

内皮素是一种由 21 个氨基酸残基组成的活性多肽,是迄今所知最强的缩血管物质,由 Jabbarli 等^[4]从培养的猪主动脉内皮细胞中分离纯化得到。近年来,有研究发现内皮素可以诱发脑血管浓度依赖性地收缩,而 EDNRA 拮抗剂可有效地抵抗这种收缩作用^[10],表明内皮素在颅内动脉收缩反应中同样具有重要作用,激活 EDNRA 是其发挥脑血管收缩作用的关键。还有研究发现 SAH 动物模型在出血后 3~7 天时 EDNRA 表达明显增多,也提示 EDNRA 表达异常可能是 DCVS 发生的机制之一^[11]。

人类 EDNRA 基因位于第 4 号染色体,目前研究发现 EDNRA 基因存在多个突变位点,包括 rs5335, rs5343, rs5333, rs1801708, rs6841581, rs6842241 等。其中 rs5335 是目前研究较多,功能较为确切的单核苷酸多态性位点,既往研究中已发现该位点基因多态性可能与多种心血管疾病、肾脏疾病及神经系统疾病易感性相关^[12,13]。Rahman 等^[14]一项纳入 248 个家族共 1 425 名家系成员的调查研究结果显示等位基因 G 可增加高血压风险,Zhang 等^[15]研究发现 rs5335 位点 CC 基因型者发生脑缺血的风险明显低于 CG 和 GG 基因型者,上述研究证据均表明 EDNRA 基因多态性可影响血管正常收缩反应。

本研究以中国北方汉族 aSAH 患者为研究对象,研究结果显示在等位基因模型和显性基因模型下,DCVS 组和对照组患者 EDNRA 基因 rs5335 位点多态性差异均具有统计学意义,而在隐性基因模型下两组差异无统计学意义,提示携带等位基因 C 的突变杂合子和突变纯合子均可能减低 DCVS 发生的危险度。本研究进一步采用二分类多因素

Logistic 后退逐步回归法分析,结果显示 aSAH 患者携带等位基因 C 可降低 DCVS 发生风险,再次提示 EDNRA 基因 rs5335 位点多态性与 aSAH 患者发生 DCBS 密切相关。本研究还发现发热和高 Fisher 等级的 aSAH 患者发生 DCVS 危险因素,提示对于并发发热及高 Fisher 等级的 aSAH 患者,需要更加仔细评估其发生 DCVS 的可能性,及时予以相关处理,选择更合适的治疗方案。

当然,本研究也存在不足之处,DCVS 发病机制十分复杂,不仅与局部复杂多变的病理生理状况相关,还可能是多基因共同表达的结果,EDNRA 基因多态性与其他因素、其他基因相互作用的具体机制也仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Della Pepa GM, Scerrati A, Albanese A, et al. Protective effect of external ventricular drainage on cerebral vasospasm. A retrospective study on aneurysmal SAH treated endovascularly [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2014, 124:97-101.
- [2] Kühn AL, Balamir JS, Grunwald IQ. Current management and treatment of cerebral vasospasm complicating SAH [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(2):233-241.
- [3] 刘高飞, 杭春华. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者延迟性脑缺血的 CT 灌注成像评价 [J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13(6):297-301.
- [4] Liu GF, Hang CH. CT perfusion imaging evaluation of delayed cerebral ischemia in the patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases, 2016, 13(6):297-301.
- [5] Jabbarli R, Reinhard M, Shah M, et al. Early vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage predicts the occurrence and severity of symptomatic vasospasm and delayed cerebral ischemia [J]. Cerebrovas Dis, 2016, 41(5/6):265-272.
- [6] 鹿永, 李娜, 沈烈, 等. 细胞因子 ET-1, IL-1 β 和 IL-6 在脑脊液和血清中的差异表达及其意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5):27-29.
- [7] Lu Y, Li N, Shen L, et al. Significance of cytokines ET-1, IL-1 β and IL-6 expression in sera and cerebrospinal fluid [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(5):27-29.
- [8] Connolly ES, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. Stroke, 2012, 43(6):1711-1737.

- [7] 刘 艳,朱明秋,林丽晴,等. 尼莫地平防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的疗效分析[J]. 神经损伤与功能重建,2014,9(3):249-250.
Liu Y, Zhu MQ, Lin LQ, et al. The effect of nimodipine on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2014, 9(3): 249-250.
- [8] He Z, Sun X, Guo Z, et al. The correlation between COMT gene polymorphism and early cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(Pt 1): 233-238.
- [9] Rueffert H, Gumpfinger A, Renner C, et al. Search for genetic variants in the ryanodine receptor 1 gene in patients with symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2011, 15(3): 410-415.
- [10] 李 娜,程晋成,王水平,等. 脑脊液和血清内皮素-1, 白介素-1 β , 白介素-6 检测对急性颅脑损伤严重程度的评估意义[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5): 77-80.
Li N, Cheng JC, Wang SP. Significance of ET-1, IL-1 β , IL-6 in serum and CSF of patients with acute craniocerebral injury[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(5): 77-80.
- [11] Vatter H, Konczalla J, Weidauer S, et al. Effect of delayed cerebral vasospasm on cerebrovascular endothelin A receptor expression and function[J]. J Neurosurg, 2007, 107(1): 121-127.
- [12] Aydin AF, Vural P, Oruc U, et al. The evaluation of endothelin 1 (EDN1) and endothelin receptor type A (EDNRA) gene polymorphisms in Hashimoto's thyroiditis[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 21(1): 181-185.
- [13] Kosior-Jarecka E, Wróbel-Dudzińska D, tukasik U, et al. Plasma endothelin-1 and single nucleotide polymorphisms of endothelin-1 and endothelin type A receptor genes as risk factors for normal tension glaucoma[J]. Mol Vis, 2016(22): 1256-1266.
- [14] Rahman T, Baker M, Hall DH, et al. Common genetic variation in the type A endothelin-1 receptor is associated with ambulatory blood pressure: a family study[J]. J Hum Hypertens, 2008, 22(4): 282-288.
- [15] Zhang L, Sui R. Effect of SNP polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRB gene on ischemic stroke[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(1): 233-239.

收稿日期:2017-08-09

修回日期:2017-09-07

(上接55页)与ICA无显著相关性。其中, Tim-3 mRNA 和 Tim-3⁺ 细胞比例与临床指标间相关性并不一致, 这可能是因为 Tim-3 mRNA 为转录水平, Tim-3⁺ 细胞比例检测的是其蛋白水平, 而转录后水平受到多因素调控可能是造成其中不一致的原因。Tim-3 与 GAD65 呈显著相关性可能是因为 T1DM 患者中约 90% 以上 GAD65 抗体阳性, 而 ICA 阳性率则较低。

据此, 本研究首次证实 Tim-3 在 T1DM 患者中表达显著上调, 并与 T1DM 疾病相关临床指标密切相关, 表明 Tim-3 可能参与 T1DM 的发病过程, 并可能成为 T1DM 临床治疗的潜在靶点, 为其治疗提供新思路。

参考文献:

- [1] 张秀华, 徐少丽. 1 型糖尿病家系一级亲属血清 GADA, IA-2A 和 IAA 测定的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(6): 45-47.
Zhang XH, Xu SL. Serum GADA, IA-2A and IAA in first-degree relatives of type 1 diabetes patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medical, 2007, 22(6): 45-47.
- [2] 贾实磊, 李成荣, 王国兵, 等. 1 型糖尿病患儿 CD4⁺T 细胞亚群变化初探[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(4): 309-314.
Jia SL, Li CR, Wang GB, et al. Investigation of the change of CD4⁺T cell subset from children with type 1 diabetes[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2010, 30(4): 309-314.
- [3] Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4⁺ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(9): 2492-2501.
- [4] Zhang XM, Shan NN. The role of T cell immunoglobulin and mucin domain-3 in immune thrombocytopenia[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2014, 79(4): 231-236.
- [5] Uchida Y, Ke B, Freitas MC, et al. T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6): 2195-2206.
- [6] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. Science, 2007, 318(5853): 1141-1143.
- [7] 李艳玲, 崔焕焕, 陈 晔, 等. 1 型糖尿病合并自身免疫性甲状腺疾病患者临床特征和外周血相关血细胞因子表达水平的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(24): 11201-11204.
Li YL, Cui HH, Chen Y, et al. Related cytokines expression level in peripheral blood of patients with diabetes mellitus and autoimmune, thyroid disease[J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2013, 7(24): 11201-11204.
- [8] 叶 剑, 齐 晖, 李富荣. 免疫抑制在预防 1 型糖尿病发病中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(8): 760-762.
Ye J, Qi H, Li FR. The role of immunosuppression in pathogenesis of type 1 diabetes[J]. Journal of Chinese Immunology, 2011, 27(8): 760-762.

收稿日期:2015-08-06

修回日期:2016-12-31